

CELL CULTURE SUBSTRATE

Publication number: JP6335381

Publication date: 1994-12-06

Inventor: AOKI TAKASHI; OGATA NAOYA; KUMAKURA KOUNOSUKE

Applicant: DAINIPPON PRINTING CO LTD

Classification:

- international: **C12M1/22; C12M3/00; C12M1/22; C12M3/00; (IPC1-7):**
C12M3/00; C12M1/22

- European:

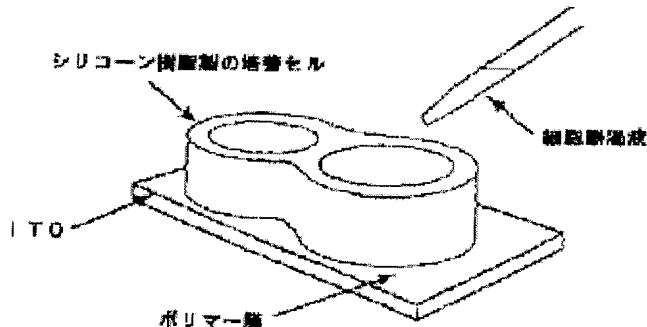
Application number: JP19930127593 19930528

Priority number(s): JP19930127593 19930528

Report a data error here

Abstract of JP6335381

PURPOSE:To obtain a cell culture substrate capable of retaining its adsorption performance for cells as well as cultured cell performance, by providing the surface of a substrate with a polymeric film through electrolytic polymerization to ensure cells to be stably adsorbed onto the substrate surface and cultured. **CONSTITUTION:**The surface of a glass substrate is first provided with an electrically conductive transparent film such as of ITO or tin oxide by sputtering technique, and an electrolytically polymerized film of polypyrrole is then grown on the transparent film by making a constant current electrolysis 2.1mA/cm² in current density for an aqueous solution prepared by adding 0.1M of pyrrole and 0.05M of sodium chloride as supporting electrolyte. The resultant substrate is then dipped in a 70% aqueous ethanol solution to carry out through washing with sterilization, and dried in a clean bench, thus obtaining the objective cell culture substrate having the above-mentioned advantages.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-335381

(43) 公開日 平成6年(1994)12月6日

(51) Int.Cl.⁵

C 1 2 M 3/00
1/22

識別記号

庁内整理番号

A

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平5-127593

(22) 出願日

平成5年(1993)5月28日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年5月12日、
社団法人高分子学会発行の「高分子学会予稿集42巻3号
に」に発表

(71) 出願人 000002897

大日本印刷株式会社

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

(72) 発明者 青木 隆史

東京都三鷹市井口1-5-23-403

(72) 発明者 緒方 直哉

東京都杉並区阿佐ヶ谷北6-29-6

(72) 発明者 熊倉 鴻之助

東京都渋谷区神山町28-9

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 細胞培養基板

(57) 【要約】

【構成】 基板表面に電解重合法にてポリマー膜を形成
することによって基板表面に細胞を安定的に吸着し、培
養し得るようにしたことを特徴とする細胞培養基板。

【効果】 細胞への接着機能だけでなく、培養細胞の
機能を保持できる細胞培養基板が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板表面に電解重合法にてポリマー膜を形成することによって基板表面に細胞を安定的に吸着し、培養し得るようにしたことを特徴とする細胞培養基板。

【請求項2】 ポリマー膜が導電性高分子であることを特徴とする請求項1記載の細胞培養基板。

【請求項3】 基板表面に、電解重合法によるポリマー膜の規則性を有する微細なパターンを形成することによって基板表面に細胞を安定的に吸着し、培養し得るよう10にした請求項1又は2記載の細胞培養基板。

【請求項4】 基板表面に、電解重合法によるポリマー膜の所望のパターンを形成し、該パターン上に所望の細胞を該パターンの形状に沿って選択的に吸着し、培養し得るようにした請求項1又は2記載の細胞培養基板。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞を培養するための細胞培養基板に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、動植物の細胞を種々の条件下において培養する研究、あるいは特定の培養細胞の代謝活動による産生物の研究が活発に行われており、特に人工的には合成が困難であったり、あるいは、合成が極めて困難な物質を特定の細胞活動を利用して製造することが多方面において検討されている。

【0003】このような細胞の培養は、通常、細胞を多糖類、タンパク質、ポリスチレン等の高分子物質（特開昭58-89179号公報、特開昭59-164015号公報、特開昭60-257745号公報、特開昭61-52281号公報）あるいはそれらを表面処理した基体等の培養床に植込みあるいは接種したものを、例えば培地中におく、当該細胞株に適応した環境条件下でインキュベーションすることによって行われている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上述したように、細胞の培養は、通常、培養床に細胞を播種したものを培地中に存在させ、当該細胞をその培養に適した環境下におくことによって行われているが、このような細胞の培養においては、培養床の特性が大きな影響を及ぼし、例えば40正常2倍体細胞等の接着依存性細胞は培養床に接着し単層で増殖するものであるので、培養効率は培養床の特性、特にその接着性、増殖性の良否に大きく左右される。

【0005】このような細胞培養床としては、酸素プラズマあるいは空気プラズマ中で表面を酸化し、親水化処理したポリスチレンが最も一般的に用いられているが、プラズマ処理によって表面を親水化しても、親水性が不安定で、表面の均一性が悪く、かつ経時変化を起こし時間とともに親水性が劣化する等の欠点があり、このよう50

な細胞培養床による培養においては、培養効率が必ずしも十分とはいえず、新規で有用な細胞培養床の出現が強く望まれていた。

【0006】特に、細胞への接着機能だけではなく、培養細胞の機能を保持できる培養床の開発は研究者に課せられた課題であった。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の如き従来の合成樹脂等を用いた細胞培養床の問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、電解重合法にてポリマー膜を形成した基板表面が、細胞を安定的に粘着し、長期にわたって細胞の生育・増殖に関して安定したデータが得られるという事実を見いだし、本発明に完成するに至った。

【0008】即ち、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 基板表面に電解重合法にてポリマー膜を形成することによって基板表面に細胞を安定的に吸着し、培養し得るようにしたことを特徴とする細胞培養基板。

(2) ポリマー膜が導電性高分子であることを特徴とする前記(1)に記載の細胞培養基板。

(3) 基板表面に、電解重合法によるポリマー膜の規則性を有する微細なパターンを形成することによって基板表面に細胞を安定的に吸着し、培養し得るようにした前記(1)又は(2)に記載の細胞培養基板。

(4) 基板表面に、電解重合法によるポリマー膜の所望のパターンを形成し、該パターン上に所望の細胞を該パターンの形状に沿って選択的に吸着し、培養し得るようにした前記(1)又は(2)に記載の細胞培養基板。

【0009】本発明において電解重合法によるポリマー膜の形成に用いる基板としては、導電性を有する基板であれば如何なるものでもよく、例えば、金属等の導電性基板、あるいはガラス、セラミックス、金属、ポリマー等、所望の強度を有する基板上にITO、酸化錫等の透明導電膜、又は金属もしくは金属化合物をスパッタ、蒸着、化学蒸着(CVD)等を成膜したものが好ましく用いられる。

【0010】本発明においてポリマー膜を形成する高分子材料としては、電解重合可能な高分子であれば如何なるものでもよいが、導電性高分子、例えばポリピロール、ポリ(N-メチルピロール)、ポリアニリン、ポリチオフェン、ポリアセチレン、ポリアズレン、及びこれらのポリマーの繰り返し単位の一部が脂肪族アルキル基、芳香族アルキル基、エーテル基、アセチル基等にて置換されているものが好ましく用いられる。

【0011】電解重合膜は、指示電解質(ドーパント)を加えたモノマー溶液中に所望の基板表面と対向電極とに一定時間電解をかけることによって容易に作製可能である。また高分子材料が導電性高分子であると、接着性細胞が培養基板に接着した場合に接着した基板表面の性質を細胞が刺激として捕らえ細胞が示す様々な応答、例

えば、形態変化、分泌物や受容体などの発現、分化、増殖、又は細胞死にいたる等、の生化学的なシグナルを材料の電気的性質の変化としてとらえる場合、即ち細胞の出した情報伝達物質や受容にともなう電気的活動を受信するのに都合がよい。

【0012】ドーパントとしては、アニオン性の物質であれば如何なるものでも使用可能であり、例えば、塩化ナトリウム等の無機塩、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機アニオン、アニオン性の界面活性剤、1, 3, 6-ナフタレンスルホン酸、各種アミノ酸、アニオン性ペプチド、アニオン性蛋白質、ポリアクリル酸、ポリスチレンスルホン酸等が好ましく用いられる。

【0013】電解重合膜のパターン化は、電解重合膜を形成した後に行ってもよいが、あらかじめ導電性基板をパターン化しておき、このパターン上に選択的に電解重合膜を形成した方がより効率的である。導電性基板のパターン化は、一般の半導体加工に用いられているリソグラフィ手法にて容易に行うことができる。

【0014】即ち、例えばITO膜を有するガラス基板上に感光性樹脂を塗布し、所望の熱処理等を行った後、電子線描画装置等によるパターンの直接描画、又は所望のパターンを有するフォトマスクを介して露光する。この基板を所定の条件にて現像して感光性樹脂からなるパターンを得、続いて、必要に応じて熱処理等を行った後、感光性樹脂に覆われていない部分を選択的にエッチング除去し、最後に残存する感光性樹脂を除去してITOからなるパターンを得る。この基板を十分に洗浄した後、前記電解重合膜合成プロセスを行うことにより、所望の電解重合膜からなるパターンを有する基板を得ることができる。

【0015】

【作 用】本発明は、電解重合法にて形成したポリマー表面上で、種々の細胞を効率的に培養しようとするものである。本発明により電解重合法にて形成したポリマー表面上で、細胞が増殖しやすくかつ機能が維持されるという機構の詳細は不明であるが、本発明者らは次の如く考えている。

【0016】細胞の粘着機構は、細胞の表面の粘着因子（レセプター）及びその膜流動と粘着に關与する培地中のタンパク質と、培養基板の表面高次構造に深い關係があると考えられる。従って、制御された表面構造を示す基板に、まず粘着に關与するタンパク質が選択的に吸着する。この際、吸着タンパク質も基板の表面高次構造の影響を受けて吸着パターンに制御性が生じている。このタンパク質層の上に当該細胞が、膜表面のレセプターを介して粘着する。

【0017】このとき、電解重合法にて形成された基板表面が、高次構造が制御された、又は安定した表面になっているために、タンパク質や細胞の大きさ、レセプタ

一の種類等に最適な条件になっており、細胞が安定的に生育するものと考えている。

【0018】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明は下記実施例によりその技術的範囲が制限されるものではない。

（実施例1）細胞培養基板として、ガラス基板上にスパッタ法にてITOを成膜し、この上にポリピロールを電解重合法より合成したものをを用いた。

【0019】このポリピロールからなる電解重合膜は、0.1Mのモノマーと指示電解質として0.05Mの塩化ナトリウムを加えた水溶液に、電流密度が2.1mA/cm²の定電流電解を5秒間、10秒間、30秒間行い、それぞれITO上に成長させた。出来上がった基板は、70%エタノール水溶液に浸漬して充分滅菌洗浄した後、クリーンベンチ内で乾燥させた。

【0020】培養細胞としては、ウシの新鮮な副腎髓質より単離したクロマフィン細胞を用いた。クロマフィン細胞は、神経性外胚葉に由来し交感神経支配を受けてアドレナリンやノルアドレナリンといったカテコールアミンを合成・分泌する神経細胞の一種である。クロマフィン細胞を使用した理由は、比較的接着性の低い細胞のため、材料表面に対する細胞接着性の指標にしやすいことと、カテコールアミンの合成・分泌量が比較的高いので、神経伝達物質の定量評価がしやすいことからである。

【0021】培養は、培養液としてDMEM（10%ウシ胎児血清（FCS）を含む）を使い、約 1×10^5 cells/mlの細胞懸濁液を調製し、図1に示すような培養基板に播種して5%CO₂インキュベータ内37℃下で行った。評価は、培養開始一定期間後の細胞形態観察と抗チロシン水酸化酵素（TH）抗体染色による機能評価にて行った。THは、クロマフィン細胞内に存在する酵素で、チロシンを出発物質としてカテコールアミンを合成する際に、チロシンからドーパ（DOPA）への合成に關与する酵素である。このTHに対する抗体で染色された場合、細胞内にTHが存在し、カテコールアミンを合成する機能が維持されているものと考えられる。

【0022】培養開始1週間後及び2週間後に、抗体染色を行ってそれぞれの基板上で培養された細胞の機能を確認した結果、コントロールとして用いたコラーゲン上に培養した細胞と有意な差はなく、同様な染色挙動が認められた。このことと、光学顕微鏡による培養細胞の形態観察で異常がなかったことから、ポリピロールの電解重合膜上で良好な細胞培養が行えることがわかった。

【0023】（実施例2）細胞培養基板として、ITOを成膜したガラス基板上に、ポリ（N-メチルピロール）を電解重合法より合成したものをを用いた。このポリ（N-メチルピロール）からなる電解重合膜は、0.1

5

Mのモノマーと指示電解質として0.05Mの塩化ナトリウムを加えた水溶液に、電流密度が $2.1\text{mA}/\text{cm}^2$ の定電流電解を5秒間、10秒間、30秒間行い、それぞれITO上に成長させた。

【0024】出来上がった基板は、70%エタノール水溶液に浸漬して充分滅菌洗浄した後、クリーンベンチ内で乾燥させた。培養細胞としては、ウシの新鮮な副腎髄質より単離したクロマフィン細胞を用いた。培養は、培養液としてDMEM(10%FCSを含む)を使い、約 $1 \times 10^5\text{cells}/\text{ml}$ の細胞懸濁液を調製し、図1に示すような培養基板に播種して5%CO₂インキュベータ内37℃下で行った。

【0025】評価は、培養開始一定期間後の細胞形態観察と抗TH抗体染色による機能評価にて行った。培養開始1週間後及び2週間後に、抗体染色を行ってそれぞれの基板上で培養された細胞の機能を確認した結果、コントロールとして用いたコラーゲン上にて培養した細胞と有意な差はなく、同様な染色挙動が認められた。このことと、光学顕微鏡による培養細胞の形態観察で異常がなかったことから、ポリ(N-メチルピロール)の電解重合膜上で良好な細胞培養が行えることがわかった。

【0026】(実施例3)細胞培養基板として、ガラス基板上にスパッタ法にてITOを成膜し、この上にポリピロールを電解重合法より合成したものをを用いた。このポリピロールからなる電解重合膜は、0.1Mのモノマーと指示電解質として0.05Mの塩化ナトリウムを加えた水溶液に、電流密度が $2.1\text{mA}/\text{cm}^2$ の定電流電解を5秒間、10秒間、30秒間行い、それぞれITO上に成長させた。

【0027】出来上がった基板は、70%エタノール水溶液に浸漬して充分滅菌洗浄した後、クリーンベンチ内で乾燥させた。培養細胞としては、ウシの新鮮な副腎髄質より単離したクロマフィン細胞を用いた。培養は、培養液としてDMEM(10%FCSを含む)を使い、約

6

$1 \times 10^5\text{cells}/\text{ml}$ の細胞懸濁液を調製し、図1に示すような培養基板にシリコン樹脂製のセルを設けた培養床に播種して5%CO₂インキュベータ内37℃下で行った。

【0028】培養開始1週間後に、培養細胞にアセチルコリンを加えて細胞を刺激し、合成及び細胞から放出された神経伝達物質であるカテコールアミンを高速液体クロマトグラフィーにて定量した。その結果、クロマフィン細胞が合成したカテコールアミン量(図2)は、コントロールとして用いたコラーゲン上にて培養した細胞の合成量と差がなかった。このことから、電解重合によるポリピロール膜が細胞に対して障害を起こさないことがわかった。

【0029】また、カテコールアミンの放出量はコラーゲンに対し、約2倍量であり(図3)、ポリピロール膜上で培養されたクロマフィン細胞がアセチルコリン刺激に対してカテコールアミンを放出しやすくなることがわかった。

【0030】
【発明の効果】本発明によれば、細胞への接着機能だけではなく、培養細胞の機能を保持できる細胞培養基板を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に用いた細胞培養基板の一例を示す図である。

【図2】培養細胞が合成したカテコールアミン量を示す図である。

【図3】培養細胞が放出したカテコールアミン量を示す図である。

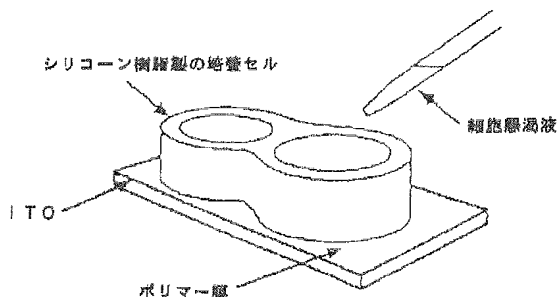
【符号の説明】

Py1 合成時間5秒間のポリピロール

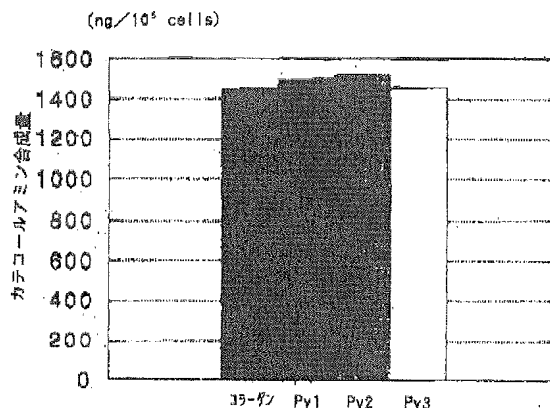
Py2 合成時間10秒間のポリピロール

Py3 合成時間30秒間のポリピロール

【図1】



【図2】



(5)

特開平6-335381

【図3】

